

Gabriel Rocha Rozendo Pinto

UTILIZAÇÃO DE TESTE HISTOQUÍMICO PARA DETERMINAR A
VIABILIDADE DE GRÃOS DE PÓLEN DA ESPÉCIE *Passiflora setacea* DURANTE
A ANTESE FLORAL.

UTILIZAÇÃO DE TESTE HISTOQUÍMICO PARA DETERMINAR A
VIABILIDADE DE GRÃOS DE PÓLEN DA ESPÉCIE *Passiflora setacea* DURANTE
A ÂNTESE FLORAL.

TESTE HISTOQUÍMICO PARA DETERMINAR A VIABILIDADE DE GRÃOS DE
PÓLEN DE *Passiflora setacea*.

Gabriel Rocha Rozendo Pinto¹, Andrea Marilza Libano².

RESUMO

O maracujazeiro é representante da ordem Passiflorales, família Passifloraceae, os quais estão distribuídos em 12 gêneros. A espécie *Passiflora setacea*, também conhecida como Maracujá-do-sono, é exemplo de cultivo experimental voltado ao melhoramento genético e a utilização da mesma como porta-enxertos devido à presença de substâncias químicas com potencial resistência a moléstias e à morte precoce. No Distrito Federal, a antese dessa espécie inicia-se por volta das 19h e a flor permanece aberta até a manhã do dia seguinte. Neste trabalho investigou-se a melhor opção de corante para teste histoquímico com os grãos de pólen da referida espécie e verificou-se a taxa de viabilidade em quatro tempos distintos pós-antese dos mesmos. A coleta do material biológico ocorreu em um plantio experimental em Planaltina-DF, das 20 horas às 2 horas do dia seguinte em intervalos de 2 horas, e os grãos foram imediatamente armazenados em tubos de eppendorf, previamente preparados com os corantes: Solução de Alexander e Carmim Acético (5%). Para o teste histoquímico, os grãos armazenados foram colocados em placas de petri e posteriormente analisados em Microscópio. Para verificar a taxa de viabilidade dos grãos, usou-se o teste de Kruskal-Wallis no software Bioestat 5.3®. Foi percebido que a Solução de Alexander corou o pólen com maior eficiência do que o Carmim Acético, podendo ser considerado a melhor opção para esta espécie. E que a taxa de viabilidade do pólen é classificada com alta apesar do decréscimo ao longo da antese floral.

PALAVRAS-CHAVE: Viabilidade Polínica. Grão de pólen. *Passiflora setacea*. Corante. Maracujá. Solução de Alexander.

¹ Graduando no curso de Bacharel em Ciências Biológicas do Centro Universitário de Brasília - UniCEUB.

² Mestre em Botânica e Professora do curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

USE OF HISTOCHEMICAL TEST TO DETERMINE THE VIABILITY OF *Passiflora setacea*'s POLLEN THROUGHOUT THE ANTHESIS.

ABSTRACT

The passion fruit is representative of the family Passifloraceae, Passiflorales order. The species *Passiflora setacea*, also known as sleeping-Passion fruit, is an example of experimental cultivation returned to the breeding and use of same as rootstocks due to the presence of chemicals with potential resistance to disease and early death. In the Federal District, the flowering of this species starts around 19h and the flower remains open until the following morning. In this paper we investigated the best option for dye histochemical test with the pollen of that species and found the rate of viability in four different time points post-anthesis them. The collection of biological material occurred in an experimental planting in Planaltina-DF, from 8 pm to 2 am at intervals of two hours, and the grains were immediately stored in Eppendorf's tubes previously prepared with dyes: Alexander Solution Acetic Carmine (5%). For histochemical test, stored grain were placed in petri dishes and subsequently analyzed in a microscope. To check the viability rate of the grains, we used the Kruskal-Wallis test on the software BioStat ® 5.3. It was noticed that the solution Alexander blushed pollen more efficiently than acetic carmine being considered the best option for this species. And the rate of pollen viability is classified with high despite declining throughout anthesis.

KEY-WORDS: Pollen viability. Pollen grain. *Passiflora setacea*. Dye testing. Passion fruit. Solution of Alexander.

1. INTRODUÇÃO

O maracujazeiro é representante da ordem Passiflorales, família Passifloraceae, os quais estão distribuídos em 12 gêneros nas regiões tropicais e temperadas quentes da América, África e Ásia (Bernacci *et al.*, 2003). Quanto ao número de espécies, há na literatura a estimativa em torno de 500 a 600 espécies (Escobar, 1988; Bernacci *et al.*, 2003). Na América Latina, a família Passifloraceae, é representada por cinco gêneros: *Tetrastylis*, *Ancistrotryrsus*, *Mitostemma*, *Dilkea* e *Passiflora* L. Este último é o que possui mais representantes, cerca de 400 espécies (Cervi, 1997). Já no Brasil, há a presença de representantes dos gêneros: *Dilkea* e *Passiflora* L (Costa *et al.*, 2009)

O gênero *Passiflora* L compreende as trepadeiras herbáceas ou lenhosas, apresentando-se como ervas e arbustos de hastes cilíndricas ou quadrangulares, angulosas, suberificadas, glabras ou pilosas (Costa *et al.*, 2009). É o mais representativo em número de espécies e com maior importância comercial no Brasil (Cervi & Linsingen, 2008). As diferentes espécies desse gênero são cultivadas comercialmente com intuítos distintos: utilização na indústria alimentícia e extração de princípios ativos presentes em suas folhas e ramos para posterior utilização como fármacos e cosméticos (Silva *et al.*, 2005)

É uma fruta bastante popular no Brasil, pelo motivo de seu fruto ser comestível – consumido *in natura*, forma de suco e geleia e etc. – e ter elevado valor nutricional. As folhas possuem propriedades farmacológicas, substâncias sedativas e hipnóticas, as quais são utilizadas, por exemplo, em tratamento de disfunções nervosas e histerismos (Faleiro *et al.*, 2005). Além da sua crescente utilização como plantas ornamentais devido a grande variedade genética que a família Passifloraceae possui, como por exemplo, a diversidade de tamanho e coloração da flor (Cruz, 2008).

A cultura do maracujá difundiu-se a partir da década de 70 no Brasil e evoluiu rapidamente colocando-a entre umas das principais culturas do país (Roncatto *et al.*, 2004). No ano de 2010, a produção ocupou o oitavo lugar em valor de produção em escala municipal, a qual está presente em praticamente todos os estados da união (IBGE, 2010), sendo na Bahia, Ceará, Sergipe, Pará, São Paulo e Minas Gerais os principais pontos de plantio (Bruckner, 2000; Melleti *et al.*, 2005).

Apesar da grande diversidade de espécies existentes, a cultura do maracujá em escala comercial está restrita a poucas espécies. A mais difundida é a cultura do maracujá-azedo – *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg –, a qual é responsável pela grande maioria da produção brasileira (Melleti *et al.*, 2005), devido a qualidade dos frutos, à divulgação entre os consumidores e ao incentivo da agroindústria (Bernacci *et al.*, 2003). Outra espécie que é cultivada, ainda em menor escala, é a *Passiflora alata* Curtis, conhecida popularmente como maracujá-doce. Esta é considerada nativa do Brasil e seu cultivo não só visa o mercado de frutas frescas como o de plantas ornamentais (Madureira *et al.*, 2005). A lavoura desta espécie vem se expandindo devido ao melhor preço do produto no mercado quando comparado ao preço da *Passiflora edulis* Sims (Bernacci *et al.*, 2003).

Há também outras espécies que ocupam menor espaço nas lavouras nacionais – *Passiflora setacea*, *Passiflora cincinnata*, *Passiflora caerulea*, *Passiflora incarnata*, *Passiflora maliformis* entre outras –, contudo, para os seus cultivos tem sido utilizado voltado ao melhoramento genético, por estas espécies possuem maior resistência às pragas, doenças, morte precoce, mais facilidade de adaptação às condições climáticas adversas, maior concentração de substâncias de interesse da indústria farmacêutica (Melleti *et al.*, 2005) e alimentar (Costa *et al.*, 2008). Por esta série de benefícios inerentes às espécies silvestres é necessário foco maior no desenvolvimento de pesquisas no mérito da caracterização agrônômica, reprodutiva e molecular dessas espécies (Faleiro *et al.*, 2005).

Dentre as espécies, destaca-se o cultivo experimental de *Passiflora setacea*, também conhecida pelo nome popular maracujá-do-sono. Os trabalhos realizados com esta espécie ainda são poucos, e, geralmente, são direcionados ao melhoramento genético e a utilização da mesma como porta-enxertos devido à presença de substâncias químicas com potencial resistência a moléstias e à morte precoce (Santos *et al.*, 2005). Outras características também são encontradas na bibliografia, tais como a presença, em suas folhas e frutos, de substâncias com propriedades calmantes e soníferas (Costa *et al.*, 2008), fato que pode ser relevante para a produção em escala comercial desta espécie. No Distrito Federal, a antese – é o ato de abertura da flor – dessa espécie inicia-se por volta das 20h e a flor permanece aberta até a manhã do dia seguinte, com

algumas flores encontradas em fechamento no final da manhã. A espécie possui como prováveis polinizadores morcegos e mariposas (Junqueira *et al.*, 2005).

As flores do gênero *Passiflora* são grandes, vistosas e possuem o pólen pesado e pegajoso fato que dificulta a ação do vento como polinizador, os indivíduos da família Passifloraceae são plantas alógamas por excelência, logo, necessitam de algum agente polinizador para reproduzirem-se (Bruckner *et al.*, 2005), por isso dependem de polinização cruzada para o aumento da taxa de frutificação (Costa *et al.*, 2009) e possuem autoincompatibilidade – não germinam com o próprio grão de pólen – do tipo homomórfica e esporófito (Bruckner *et al.*, 2005). Contudo, há na bibliografia descrição de espécies desta família que são autocompatíveis – *Passiflora tenuifila*, *Passiflora elegans*, *Passiflora capsularis*, *Passiflora villosa*, *Passiflora suberosa* e *Passiflora foetida* – (Junqueira *et al.*, 2005). A autoincompatibilidade é um mecanismo importante para a determinação da alogamia, pois impede que plantas produtoras de gametas masculino e feminino produzam sementes quanto autofecundadas (Bruckner *et al.*, 2005).

A autoincompatibilidade é uma característica reprodutiva importante a ser estudada no melhoramento genético do maracujá, porque para atingir uma maior eficiência na polinização e produção de frutas é necessário que as plantas tenham suficiente diversidade genética em relação a esta característica, caso contrário à produção de sementes não ocorrerá (Bruckner *et al.*, 2005). Consequentemente para aumentar a produção em escala comercial da *Passiflora setacea* deverá ocorrer o desenvolvimento de mais pesquisas não só no âmbito dos aspectos agrônômicos, como também nas informações da biologia reprodutiva da espécie. Características como a viabilidade da estrutura reprodutiva, dentre elas a viabilidade do grão de pólen (Ramos *et al.*, 2005).

Pelo fato das espécies de maracujá, em sua maioria, serem autoincompatíveis e apresentarem problemas na hibridização interespecífica – dificuldades de cruzamento com indivíduos de outra espécie – (Bruckner *et al.*, 1995 *apud* Costa *et al.*, 2009), as pesquisas que visem aferir a viabilidade do grão de pólen, daquelas espécies, são muito importantes tanto para o melhoramento genético e maximização da produção de frutos quanto para a produção de híbridos ornamentais e principalmente para a polinização

cruzada entre os indivíduos (Bernacci *et al.*, 2005), visto a importância econômica que tais atividades representam. No caso do maracujá-azedo em áreas com grande produção – mais de 3000 plantas –, é necessário à realização de polinização manual. Em âmbito de produção comercial com espécies nativas, a possível necessidade de polinização manual não pode ser descartada, visto que a densidade de agentes polinizadores naturais não é suficiente para suportar a magnitude da produção (Junqueira, 2001).

Para a maximização da produção dessa frutífera e para a hibridização de espécies, onde exista esta possibilidade, é fundamental a importância do conhecimento da viabilidade do pólen (Jesus *et al.*, 2010). Assim, para testar a viabilidade polínica é interessante identificar o melhor horário para coleta do grão, visando aquele em que o pólen irá ter sua viabilidade máxima (Costa *et al.*, 2009). É importante salientar que, em geral, o pólen colhido a partir de flores em um bom estágio de desenvolvimento possui uma boa viabilidade, dispensando o teste de viabilidade, contudo, muitas vezes ocorre do pólen ser conseguido, pelo pesquisador, através de intercâmbios, fato que justifica o teste antes do uso (Einhardt *et al.*, 2006). Outro fator que justifica a importância do teste da viabilidade polínica é a duração da mesma pós-antese floral, pois, mesmo na presença de polinizadores em abundância, para o desenvolvimento de frutos contendo muitas sementes, é necessário que um número alto de grãos de pólen viáveis sejam depositado no estigma da flor (Teixeira, 1995 *apud* Hoffmann *et al.*, 2000).

Há quatro métodos utilizados para aferir a viabilidade polínica, são elas: germinação *in vitro*, coloração histoquímica, germinação *in vivo* e porcentagem de frutificação específica (Galleta, 1983 *apud* Costa *et al.*, 2009). Eventualmente, grãos de polens, de um mesmo indivíduo, testado em metodologias diferentes serão encontrados resultados diferentes, pois nenhum destes testes é completamente satisfatório. Assim, grãos considerados viáveis em um dos testes, em contrapartida poderão ser considerados inviáveis quando testado por outro método (Stanley & Linskens, 1974 *apud* Einhardt *et al.*, 2006).

Teste que utilizam a coloração histoquímica são comumente utilizados para a verificação de viabilidade de grãos de pólen devido ao baixo custo envolvido na preparação do ensaio e a rapidez com que são obtidos os resultados (Lins *et al.*, 2010). Apesar desses fatores, este tipo de método é conhecido por superestimar a porcentagem

de germinação dos pólen. Alguns corantes são mais utilizados que outros, tais como o sal de Tetrazólio, Solução de Lugol, Solução de Alexander e Carmim Acético (Einhardt *et al.*, 2006). A Solução de Alexander é um corante que distingue bem os grãos viáveis dos inviáveis nas maiorias das angiospermas (Damasceno Júnior *et al.*, 2008), o Carmim Acético também é muito utilizado em análises de rotina de laboratórios, contudo há algumas limitações na reação com algumas espécies (Zanotto *et al.*, 2009).

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer protocolo de verificação de viabilidade de grão de pólen, pelo método de coloração histoquímica, para a espécie *Passiflora setacea*, variedade BRS Pérola do Cerrado do programa de melhoramento da Embrapa Cerrados. E verificar variações na viabilidade pós-antese de flores em um cultivo experimental na cidade de Planaltina-DF.

2. METODOLOGIA

Coleta do material biológico

O material biológico estudado foi coletado em um plantio experimental de *Passiflora*, da EMBRAPA Cerrados, variedade BRS Pérola do Cerrado do programa de melhoramento da empresa supracitada. Localizado em uma fazenda particular no núcleo rural do Pípiripau, em Planaltina-DF. Na coleta foi utilizada pinça de laboratório, para a retirada das anteras das flores e 24 tubos de *ependorf*, previamente preparados com corantes de Solução de Alexander (SA) e Carmim Acético 5% (CA).

A coleta foi dividida em quatro momentos, iniciada na antese da flor às 20h e finalizada às 2h. De 2h em 2h foram coletadas seis anteras de três flores de plantas diferentes, logo duas de cada flor. Sendo utilizado um total de seis tubos de *ependorf*, três tubos de cada corante em cada momento. Depois de retiradas das flores, as anteras foram imediatamente armazenadas nos tubos já com os corantes.

Teste de coloração histoquímica

Para a coloração histoquímica utilizou-se os corantes SA e CA já supracitados, pois estão entre os mais utilizados para este tipo de teste em laboratórios, estando presentes na grande maioria dos testes utilizados na bibliografia deste trabalho.

Teste de viabilidade do grão de pólen

Em laboratório foi colocado uma gota do material que estava no *ependorf* em lâminas de vidro e fechado o conjunto com lamínulas de 24x24mm – totalizando 24 lâminas – para posterior contagem de grãos de pólen viáveis e inviáveis com auxílio de microscópio óptico na objetiva de 40x e contador de células. Para a contagem dos grãos de pólen viáveis e inviáveis a área da lâmina foi dividida a cada 0,5mm, e foram sorteados, pelo método de números aleatórios, dez pontos em cada lâmina, os quais foram percorridos contando grãos viáveis e não viáveis e contabilizando-os.

No momento da contabilização da viabilidade polínica, foi levado em consideração informações presente na bibliografia levantada para o trabalho, a qual relata que o corante SA reage com a parede celular e protoplasma do grão de pólen, refletindo a cor púrpura para células viáveis e a cor verde para células inviáveis. Já o corante CA reage com os cromossomos da célula, refletindo a cor vermelha para as viáveis e as inviáveis não reagem, logo não ficam coradas. (Hoffman & Varassin, 2012).

Além da coloração, foram considerados grãos de pólen viáveis aqueles cujo protoplasma apresentava-se de forma íntegra, sem deformação. Os inviáveis, os grãos de pólen deformados, colapsados, rompidos e os grãos de pólen muito pequenos em relação aos demais, com pouco protoplasma e exina fina, sendo aqui considerados como desenvolvimento incompleto.

Análise estatística da viabilidade do grão de pólen

A análise estatística da viabilidade do grão de pólen foi realizada pelo Teste de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$) por posto, presente no software Bioestat 5.3®. Este teste é uma alternativa não-paramétrica utilizada para comparar amostras aleatórias independentes e decidir se as mesmas proveem de populações diferentes (Siegel & Castellan Jr., 2006). Assim como a maioria dos testes não-paramétricos, Kruskal-Wallis também faz a comparação dos tratamentos na forma de postos. Com isso, quanto maior for a diferença da soma desses postos, maior será a evidência que exista diferença entre os mesmos (Reis & Ribeiro Júnior., 2007).

Para a diferença da viabilidade de grão de pólen entre as flores amostradas, foi testada a hipótese em que há diferença entre o número de pólenes viáveis entre as flores amostradas nos diferentes horários de coleta testados.

3. RESULTADOS.

Para a coloração histoquímica do citoplasma dos grãos de pólen de *Passiflora setacea*, o corante que se mostrou mais adequado foi o SA. Os grãos de pólen corados com essa solução apresentam citoplasma corado em púrpura e a exina em cor verde. O corante CA, na concentração utilizada de 5%, não apresentou resultado satisfatório uma vez que não conferiu coloração diferenciada às estruturas do grão de pólen e a pigmentação do protoplasma foi fraca para todas as amostras, não permitindo avaliação da viabilidade e coloração e dificultando a avaliação da integridade ou deformidade do protoplasma, como pode ser observado na Figura 1.

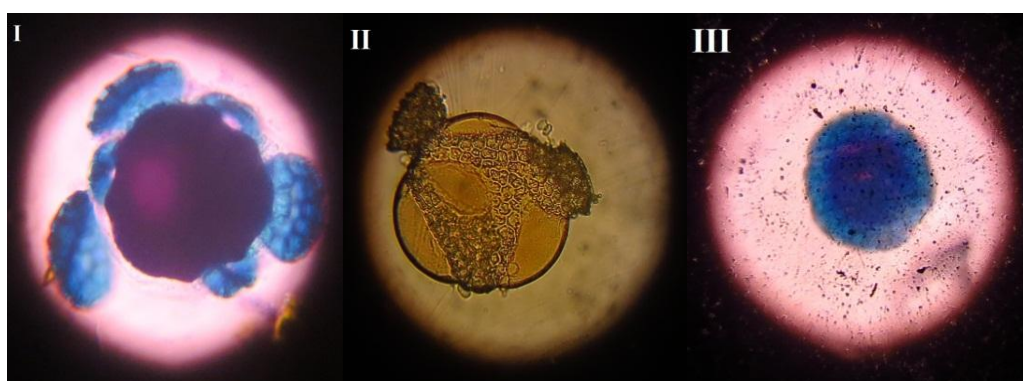


Figura 1 - (I) Grão de Pólen viável corado com Solução de Alexander. (II) Grão de Pólen corado com Carmim Acético. (III) Grão de Pólen inviável corando com Solução de Alexander.

A porcentagem de pólen viáveis nas flores de *Passiflora setacea* foi em média de 91%, com viabilidade mínima de 81,61% – registrada na flor 1 no horário 4 da coleta –, e máxima de 98,18 – registrada na flor 3 no horário 4 da coleta.

Não houve diferença significativa entre as flores avaliadas nos diferentes horários de coleta pelo teste de Kruskal-Wallis ($p = 1,469$)

4. DISCUSSÃO

Após a análise do material biológico, contido nos *eppendorf*, pode ser constatado que as lâminas nas quais foram colocadas SA como corante obtiveram melhor coloração dos grãos e maior facilidade na contabilização da viabilidade polínica quando comparadas aos pólenes corados CA, os quais refletiram ligeiramente a cor vermelha impossibilitando a distinção entre grão de pólenes viáveis e inviáveis. Essa dificuldade de coloração quando utilizado o corante de Carmim Acético indica que para essa espécie o corante na concentração utilizada – 5% – não é indicado. Esse resultado de

coloração pelo CA está de acordo com os relatos da limitação desta técnica quando aplicada em outras espécies (Zanotto *et al.*, 2009). Por outro lado, a coloração eficiente obtida pela SA dispensa o teste histoquímico com outros corantes para *Passiflora setacea*, uma vez que o mesmo corou todos os grãos de pólen, exinas isoladas na lâmina e citoplasma de células que sofreram lise, portanto eficiente para uso em coloração de pólen para a espécie estudada.

Quando analisados os resultados do teste de viabilidade do grão de pólen, observou-se que, de forma geral, a porcentagem de pólen viável é considerada alta em todos os momentos da coleta. Mesmo a menor taxa de pólen viável encontrada (81%) está acima do limiar para serem considerados pólenes com alta viabilidade, limiar este que é dado com acima de 70% são considerados pólenes de alta viabilidade, entre 31 e 69% pólenes com média viabilidade e abaixo de 30%, baixa viabilidade (Souza *et al.*, 2002). Esta alta viabilidade do gênero *Passiflora* ocorre, pois o pólen é pegajoso e possui uma substância que confere proteção evitando a desidratação do mesmo (Souza *et al.*, 2002).

A média de pólenes viáveis não variou significativamente entre as flores, indicando que não houve diferenças entre flores dentro da população. Apesar de observar variações na viabilidade nos diferentes horários de coleta a mesma não foi significativa pelo teste de Kruskal-Wallis. Outros autores apontam que a viabilidade é máxima na antese floral e vai declinando ao longo do tempo em outras espécies de *Passiflora*, como *P. edulis*, com viabilidade acima de 70% (Souza *et al.*, 2002) e 69% (Costa *et al.*, 2009), ambos após 24 horas. Esses autores não apontam se a redução no número de pólenes viáveis é significativa. No entanto, para essas espécies assim como para *Passiflora setacea* ao longo do tempo de verificação utilizado em cada estudo, a viabilidade pode ser considerada alta para todas as espécies.

A espécie *Passiflora setacea* inicia o fechamento floral no início da manhã, assim, é no período noturno que a flor está com as estruturas reprodutivas completamente expostas ao polinizador. O tempo de viabilidade de pólen na espécie *P. mucronata*, também de antese noturna, estudada por Meletti e colaboradores (2011) durou desde a antese até as primeiras horas da manhã, mas não apontam a taxa de redução em viabilidade ao longo do tempo. Tais resultados corroboram com o que foi

levantado para *Passiflora setacea*, com uma leve diferença que houve uma pequena diminuição.

O estudo da viabilidade polínica em espécies de passiflora tem interesse ecológico e econômico. A produção de frutos, e o número de sementes produzidas estão relacionados ao número de grãos de pólen viáveis que são depositados sobre o estigma da flor (Teixeira, 1995 *apud* Hoffmann *et al.*, 2000). Em *P. edulis* a formação de frutos está relacionado a alto número de pólen. Estudos realizados por Ruggiero (1987) apontam que, para a formação de frutos são necessários no mínimo 190 grãos de pólen nessa espécie. Mas o número de pólen em si, é um indicador, se a viabilidade de pólen for baixa, o número de pólen necessários pode ser ainda maior. Para *Passiflora setacea* ainda não se tem essas análises, mas o número médio de sementes por frutos é cerca de 230 (Andrea Libano, comunicação pessoal). O que sugere número próximo de pólen viáveis depositados sobre o estigma ao de sementes formadas.

Quanto ao aspecto econômico, o cultivo em escala comercial de espécies de maracujá depende da ação de agentes polinizadores, uma vez que a família apresenta várias características morfológicas que apontam autoincompatibilidade, reforçada pela autoincompatibilidade esporofítica (Bruckner *et al.*, 1995). Nesse sentido, a taxa de viabilidade polínica é um fator que influencia a produtividade.

5. CONCLUSÃO

Considerando os testes realizados e os resultados obtidos, pode-se concluir que o melhor corante para o teste histoquímico do grão de pólen da espécie *Passiflora setacea* é a Solução de Alexander, visto a ineficiência do corante Carmim Acético na concentração utilizada, embora talvez em uma concentração mais elevada possa gerar um resultado positivo. A análise estatística da contabilização de grãos de pólen viáveis e inviáveis nos horários analisados não apresentou diferenças significativas, indicando alta viabilidade do pólen do início da noite até a madrugada. A alta viabilidade dos pólen na população em estudo é importante para estudos de fatores de aborto e produtividade, uma vez que já se pode descartar a inviabilidade de pólen como um fator de influência negativa sobre outros processos reprodutivos. No tempo utilizado entre as coletas de grãos de pólen nesse estudo, não foi detectada diferenças significativas na viabilidade dos mesmos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae). **Rev. Bras. Frutic.**, 25(2): 355-356, 2003.
- BERNACCI, L.C.; MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; PASSOS, I.R.S. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. 1 ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 1(1): 558-586, 2005.
- BRUCKNER, C. H.; SUASSUNA, T. M. F.; RÊGO, M. M. do; NUNES, E. S. Auto-incompatibilidade no maracujá-implicações no melhoramento genético.. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Org.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. 1 ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 1(1): 317-338, 2005.
- BRUCKNER, C.H.; SILVA, M.M.; FALLEIRO, T.M.; ANDRADE, B.B.; MOREIRA, A.E. Viabilidade do pólen de maracujazeiro sob diferentes condições de armazenamento. **Revista Ceres**, Viçosa, 47(1), 523-531, 2000.
- CERVI, A. C. Passifloraceae do Brasil: estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **FontQuerria**, 45(1): 1-92, 1997.
- CERVI, A.C.; LINSINGEN, L.; Sinopse taxonômica das Passifloraceae Juss. no complexo de cerrado (savana) no estado do paraná – Brasil. **Iheringia série Botânica**, 63(1): 145-157, 2008.
- COSTA, A. M.; CAMPOS, A.V.S.; COHEN, K. O.; TUPINAMBÁ, D. D.; PAES, N. S.; SOUSA, H. N.; SANTOS, A.L.B. ; SILVA, K. N.; FARIA D. A. F.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F. G. Características físico-química-funcional da polpa de *Passiflora setacea* recém processada e congelada. In: **IX Simpósio Nacional Cerrado. II Simpósio Internacional Savanas Tropicais, 2008, Brasília - DF. IX Simpósio Nacional Cerrado II Simpósio Internacional Savanas Tropicais Anais**. Planaltina - DF: Embrapa Cerrados, 1(1): 1-7, 2008.
- COSTA, R. S.; M RO, F. V.; OLIVEIRA, J. C. Influência do momento de coleta sobre a viabilidade de grão-de-pólen em maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis). **Revista Brasileira de Fruticultura**, 31(1): 956-961, 2009.
- CRUZ, T. V.; SOUZA, M. M.; ROZA, F. A.; VIANA, A. J. C.; BELO, G. O.; FONSÊCA, J. W. S.; Germinação in vitro de gr os de pólen em *Passiflora suberosa* L.. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 30(1): 875-879, 2008
- DAMASCENO JÚNIOR, P.C.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G.; SILVA, F.F.; Conservação de grão de pólen de mamoeiro. **Revista Ceres**, 55(1): 433-438, 2008.
- EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. do C. B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, 28(1): 5-7, 2006.
- ESCOBAR, L. K. A new subgenus and five new species in *Passiflora* (Passifloraceae) from South America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 76(1): 877-885, 1988.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro - Desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.(Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. 1 ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, (1): 186-210, 2005.

HOFFMANN, G. M.; VARASSIN, I. G. Variação da viabilidade polínica em *Tibouchina* (Melastomataceae). **Rodriguésia**, 62(1): 223-228, 2011

HOFFMANN, M.; T. N. S. PEREIRA; M. B. MERCADANTE & A. R. GOMES. Polinização de *Passiflora edulis f. flavicarpa* (Passiflorales, Passifloraceae), por abelhas (Hymenoptera, Anthophoridae) em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. **Iheringia série botânica**, 89(1): 149–152, 2000.

IBGE, Instituto brasileiro de Geografia e Estatística, 2010.

JESUS, O. N.; SOARES, T. L.; OLIVEIRA, E.D.; MARTINS, C.A.D.; SANTOS-SEREJO, J.N. Comportamento germinativo e viabilidade polínica de Passifloras oriundos de flores coletadas em diferentes estádios e horários. In: **VI Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**, Búzios-RJ. Resumos. Campos dos Goytacazes-RJ SBMP, 2011.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI, L. C.; Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.(Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. 1 ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 1(1): 80-108, 2005.

JUNQUEIRA, N. T. V.; VERAS, M. C. M.; NASCIMENTO, A. C.; CHAVES, R. C.; MATOS, A. P.; JUNQUEIRA, K. P. **A importância da polinização manual para aumentar a produtividade do maracujazeiro**. Planaltina – DF: Embrapa Cerrados, 2001. 16p.

LINS, L. C. R.; SOARES, T. L.; COSTA, M. A. P. C. de; SANTOS-SEREJO, J. ALMEIDA. dos; OLIVEIRA E SILVA, S. de; Uso de diferentes corantes na determinação da viabilidade de grãos de pólen de bananeira. In: **Congresso Brasileiro de Fruticultura, 21. Frutas: saúde, inovação e responsabilidade: anais. Sociedade Brasileira de Fruticultura**. Natal-RN. 2010

MADUREIRA, H. C.; DUTRA, G. A. P.; PEREIRA, T. N. S.; CARVALHO, A. J. C. de; COUTINHO, K.; GABURRO, N. O. P. Avaliação da auto-incompatibilidade reprodutiva de *Passiflora alata* Curtis. **IV Reunião Técnica de Pesquisas em Maracujazeiro: trabalhos apresentados**. Planaltina-DF: Embrapa cerrados, 1(1): 143-146, 2005.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L.C.; ALVARES, V.; AZEVEDO FILHO, J. A. de; Caracterização de *Passiflora mucronata* Lam: nova alternativa de maracujá ornamental. **Revista brasileira de horticultura ornamental**, 17(1): 87-95, 2011.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I. R. da S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M.F. (Org.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina-DF: Embrapa cerrados. 1(1): 55-78, 2005.

RAMOS, J. D.; JUNQUEIRA, K. P.; PASQUAL, M.; SANTOS, F. C.; PIO, L. A. S.; FIGUEIREDO, M. A. de; Germinação de pólen do maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*). **IV Reunião Técnica de Pesquisas em Maracujazeiro: trabalhos apresentados**. Planaltina-DF: Embrapa cerrados, 1(1): 143-146, 2005.

REIS, G. M.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I.; Comparação de testes paramétricos e não-paramétricos aplicados em delineamento experimental. **III SAEPRO**. Universidade federal de Viçosa–MG, 1(1): 1-13, 2007.

RONCATTO, G.; OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C.; NOGUEIRA FILHO, G. C.; CENTURION, M. A. P. C.; FERREIRA, F. R. Comportamento de maracujazeiro (*Passiflora spp.*) quanto à morte prematura. **Revista brasileira de fruticultura**. Jaboticabal-SP, 26(3): 552-554, 2004.

RUGGIERO, C. **Cultura do maracujazeiro**, Ribeirão Preto-SP. Legis Summa, 1987. 250p.

SANTOS, F. C.; RAMOS, J. D.; SANTOS, F. C.; LIMA, L. C. O.; JUNQUEIRA, K. P.; REZENDE, J. C.; Características físico-químicas do maracujazeiro silvestre *Passiflora setacea*. **IV Reunião Técnica de Pesquisas em Maracujazeiro: trabalhos apresentados**. Planaltina-DF: Embrapa cerrados, 1(1): 143-146, 2005.

SIEGEL, S. & CASTELLAN JR., N. J. **Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento**. Tradução de Sara Ianda Correa Carmona. 2ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2006. p. 235-244.

SILVA, A. C. da; SILVA, A. C.; LUCENA, C. C. de; ALMEIDA, F. F. D. de; VASCONCELLOS, M. A. S. Crescimento e desenvolvimento de espécies passifloras. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PINTO, A.C.Q.; SOUSA, E.S. (Eds.). **IV Reunião Técnica de Pesquisas em Maracujazeiro: trabalhos apresentados**. Planaltina-DF: Embrapa cerrados, 1(1): 137-142, 2005

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; MARTINS, E.R. Microsporogênese associada ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras-MG, 26(1): 1209-1217, 2002.

ZANOTTO, M.; BRAMMER, S. P.; JÚNIOR, A. N.; SCAGLIUSI, S. M. Viabilidade polínica como seleção assistida no programa de melhoramento genético de Triticale. **Ciência e agrotecnologia**. Lavras-MG, 33(1): 2078-2082, 2009.